

University of Groningen

De genetische fijnstructuur van een lysine gen bij *Aspergillus nidulans*

Pees, Elisabeth

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1966

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Pees, E. (1966). *De genetische fijnstructuur van een lysine gen bij Aspergillus nidulans*. Druco.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

SAMENVATTING

De klassieke opvatting, dat genetische recombinatie het gevolg is van een preciese, reciproke uitwisseling tussen twee van de vier draden van een meiotische tetraade, heeft de laatste jaren een belangrijke wijziging moeten ondergaan.

Door de ontdekking van voedingsmutanten bij micro-organismen en het toepassen van selectieve technieken bij kruisingen tussen deze mutanten, is het mogelijk recombinatie frequenties te meten in de orde van grootte van 10^{-6} . Bij de analyse van een groot aantal kruisingen tussen mutanten, die tot een zelfde genlocus behoren (allelen) en waarbij nauwgekoppelde mutanten als markeergenen gebruikt zijn, komen verschijnselen naar voren, die niet meer in het klassieke beeld passen. Recombinatie tussen allelen gaat vaak samen met afwezigheid van reciproke producten (3:1 segregatie) en wordt gekenmerkt door negatieve interferentie.

Voor de verdere analyse van dit verschijnsel is het van belang over een groot aantal gedetailleerde gegevens te kunnen beschikken. Het voornaamste doel van het in dit proefschrift beschreven onderzoek is de analyse van allele kruisingen bij de Ascomycet *Aspergillus nidulans*. Hiervoor zijn de volgende mutanten noodzakelijk: a) een ruime collectie allele mutanten, waarbij de keuze is gevallen op lysine behoeftige mutanten (pag. 11), b) enkele geschikte nauwgekoppelde markeergenen.

Daar het percentage mutaties na een mutagene behandeling, zoals UV, slechts 0,1 - 1% bedraagt, is bij de isolatie van nieuwe mutanten (hoofdstuk I) gebruik gemaakt van een selectiemethode om het aantal mutanten onder de overlevende sporen te verhogen. Hiertoe zijn de met UV bestraalde sporen geënt op een vloeibaar medium, waarop alleen de niet-gemuteerde sporen kunnen kiemen. Vervolgens is een warmtebehandeling toegepast (10 min. in een waterbad van 50° C), waardoor een groot gedeelte van de gekiemde sporen uitgeschakeld wordt. Het percentage mutanten onder de overlevende sporen nam op deze wijze toe tot ongeveer 30%. In totaal zijn een 700-tal mutanten geïsoleerd. Evenals bij andere selectiemethoden wordt ook hier het spectrum van mutanten wel beïn-

vloed, waardoor sommige soorten mutaties nauwelijks, en andere soorten juist in grote hoeveelheden voorkomen. De oorzaak hiervan is niet duidelijk.

De 240 nieuw verkregen lysine mutanten kunnen over zes loci verdeeld worden. Tot nu toe waren slechts twee lysine loci bij *Aspergillus nidulans* bekend. De 127 histidine mutanten vertegenwoordigen op zijn minst vijf loci. De vier nieuwe lysine loci, de vijf histidine loci en één isoleucine locus zijn gedeeltelijk ge-localiseerd.

Er zijn twee groepen mutanten, die geschikt zijn voor verder onderzoek: 1) het lys-51(FL) locus met 14 allelen, gelocaliseerd op de rechterarm van het 1^e chromosoom, met de markeergenen pro-1 en paba-2 (respectievelijk 6 en 4,5 ME van lys-51 verwijderd), 2) het lys-7(DL) locus met 60 allelen, gelegen op het 7^e chromosoom en met de markeergenen mal-1 en his-122(EL) (respectievelijk 14,2 en 12,9 ME van lys-7 verwijderd). De keuze is gevallen op het lys-51(FL) gen, daar hiervan de juiste ligging ten opzichte van het centromeer bekend is. Twaalf van de veertien allelen zijn door recombinatie te onderscheiden en kunnen lineair binnen het locus gerangschikt worden (hoofdstuk II). De verkregen lysine prototrophe recombinanten bij enkele mutantenvparen met zeer lage recombinatie frequenties ($1-4 \times 10^{-7}$), nl. 51 en 74, en 56 en 89, zijn dusdanig afwijkend, dat niet vastgesteld kon worden, of deze mutaties op de zelfde plaats, of zeer dicht naast elkaar gelegen zijn. De andere recombinatie frequenties variëren van 0,03 - $26,9 \times 10^{-5}$. Vergeleken bij de resultaten van andere onderzoekers moet geconcludeerd worden, dat de mutanten slechts over een klein gebied verspreid voorkomen. De mutanten vallen uiteen in drie groepen A, B en C ("clusters") van zeer nauwegekoppelde mutanten (zie afb. 1, pag. 54). Interallele complementatie werd nergens waargenomen.

Bij de lysine prototrophe recombinanten, afkomstig uit de allele kruisingen, is het gedrag van de markeergenen bekeken (hoofdstuk III). Zoals te verwachten was, treedt er negatieve interferentie op. De intensiteit van de negatieve interferentie (NI) is praktisch bij geen enkele kruising aan beide zijden van het onderzochte gebied gelijk: er is gepolariseerde NI. Er wordt hierbij een correlatie geconstateerd tussende localisatie van de mutanten binnen het gen en het patroon van de NI. Bij kruisingen tussen mutanten uit het B cluster blijkt, dat zich binnen deze groep, nabij mutant 12.21, een kritiek punt ("omkeringspunt") bevindt.

Kruisingen, uitgevoerd tussen mutanten proximaal van dit punt gelegen, geven alle een proximaal gerichte NI, terwijl bij kruisingen tussen mutanten, distaal van dit punt gelegen, een distaal gepolariseerde NI geconstateerd wordt. Er komen, in verband met de gepolariseerde NI, dus twee basispatronen naar voren, namelijk een proximaal en een distaal patroon, waarop de recombinatie frequenties geen invloed uitoefenen. Wanneer twee mutanten gekruist worden, die ter weerszijden van 12.21 gelocaliseerd zijn, interfereren beide basispatronen met elkaar, waarbij de mate, waarin elk patroon bijdraagt tot het uiteindelijke beeld, ongeveer evenredig is met de recombinatie afstanden van beide gebruikte mutant tot 12.21. De NI is steeds met een min of meer constant bedrag aanwezig.

De resultaten zijn met reeds bekende hypothesen vergeleken. De meeste hypothesen ("gefixeerde effectieve paring", "polaronmodel" "polaron-hybride hypothese") gaan uit van een verdeling van het genetische materiaal in segmenten, die onderling samenhangen door verbindingselementen, en waarbinnen alle verschijnselen van recombinatie, zoals deze zich voordoen bij allele kruisingen, zich afspelen ("recombination regions"). Wanneer men zich het lys-51(FL) locus over twee segmenten verdeeld denkt, passen de gegevens in enkele van deze hypothesen. Bij "gefixeerde effectieve paring" stelt het kritieke "omkeringspunt" dan de grens tussen beide segmenten voor (pag. 80), terwijl volgens het polaronmodel op dit punt de replicatie van het DNZ zou beginnen. De algemene veronderstelling is echter, dat één segment samenvalt met één gen. De gedachte, dat een functionele eenheid zoals het gen, onderbroken zou kunnen zijn door een structuur van een andere chemische samenstelling dan het DNZ (verbindingselement), lijkt zeer onwaarschijnlijk. Men kan zich afvragen, of alleen verbindingselementen de grenzen van "recombination regions" kunnen vormen, of dat ook andere factoren, zoals bijv. bijzondere configuraties binnen het DNZ, hiervoor in aanmerking kunnen komen. Uiteindelijk is ook het bestaan van verbindingselementen volkomen hypothetisch. Het is onjuist gebleken op grond van de tot nu toe bekende gegevens, te stellen, dat een "recombination region" of "polaron" overeen zou komen met een gen.

Kruisingen, uitgevoerd tussen mutanten proximaal van dit punt gelegen, geven alle een proximaal gerichte NI, terwijl bij kruisingen tussen mutanten, distaal van dit punt gelegen, een distaal gepolariseerde NI geconstateerd wordt. Er komen, in verband met de gepolariseerde NI, dus twee basispatronen naar voren, namelijk een proximaal en een distaal patroon, waarop de recombinatie frequenties geen invloed uitoefenen. Wanneer twee mutanten gekruist worden, die ter weerszijden van 12.21 gelocaliseerd zijn, interfereren beide basispatronen met elkaar, waarbij de mate, waarin elk patroon bijdraagt tot het uiteindelijke beeld, ongeveer evenredig is met de recombinatie afstanden van beide gebruikte mutant tot 12.21. De NI is steeds met een min of meer constant bedrag aanwezig.

De resultaten zijn met reeds bekende hypothesen vergeleken. De meeste hypothesen ("gefixeerde effectieve paring", "polaronmodel" "polaron-hybride hypothese") gaan uit van een verdeling van het genetische materiaal in segmenten, die onderling samenhangen door verbindungselementen, en waarbinnen alle verschijnselen van recombinatie, zoals deze zich voordoen bij allele kruisingen, zich afspelen ("recombination regions"). Wanneer men zich het lys-51(FL) locus over twee segmenten verdeeld denkt, passen de gegevens in enkele van deze hypothesen. Bij "gefixeerde effectieve paring" stelt het kritieke "omkeringspunt" dan de grens tussen beide segmenten voor (pag. 80), terwijl volgens het polaronmodel op dit punt de replicatie van het DNZ zou beginnen. De algemene veronderstelling is echter, dat één segment samenvalt met één gen. De gedachte, dat een functionele eenheid zoals het gen, onderbroken zou kunnen zijndoor een structuur van een andere chemische samenstelling dan het DNZ (verbindungselement), lijkt zeer onwaarschijnlijk. Men kan zich afvragen, of alleen verbindungselementen de grenzen van "recombination regions" kunnen vormen, of dat ook andere factoren, zoals bijv. bijzondere configuraties binnen het DNZ, hiervoor in aanmerking kunnen komen. Uiteindelijk is ook het bestaan van verbindungselementen volkomen hypothetisch. Het is onjuist gebleken op grond van de tot nu toe bekende gegevens, te stellen, dat een "recombination region" of "polaron" overeen zou komen met een gen.

SUMMARY

The classical view of genetical recombination as a precise reciprocal exchange between two of the four members of the meiotic tetrad has undergone important changes in recent years.

Through the extensive application of nutritional mutants in microorganisms and through the use of selection techniques in making crossings between these, it has been possible to measure recombination frequencies in the range of 10^{-6} .

When a large number of crossings between mutants belonging to the same locus (alleles) is analysed with the help of closely linked marker genes, results are found which do not fit with the classical concept. Recombination between alleles is often marked by the absence of one of the reciprocal products (3:1 segregation) and by negative interference.

The further investigation of these phenomena requires a great number of detailed data. The main purpose of this thesis work has been such an analysis of allelic crosses in the Ascomycete *Aspergillus nidulans*. For this we required a large series of allelic mutants, and selected herefore lysine heterotrophic mutants, and secondly, we required suitable closely linked marker genes.

Since the percentage of mutants produced by a mutagenic treatment, as for instance UV irradiation, is only 0.1 to 1%, use has been made of a technique in selection to increase the number of mutants in the surviving spores (Chapter I).

The spores after irradiation with UV were inoculated in liquid medium in which only the non-mutated spores could germinate. The germinated spores were then killed by a heat treatment (10 min in a water bath of 50°C). Of the surviving spores that germinated later up to 30% were mutants. It was possible thus to isolate 700 mutants. Some types of mutant very seldom appear and some were repeatedly obtained, due to factors which are as yet unknown.

Of the 240 newly obtained lysine mutants 6 loci could be identified, whereas previously 2 lysine loci had been known in *Aspergillus nidulans*. The 127 histidine mutants are distributed over at least 5 loci. The four new lysine loci and the 5 histidine loci as well as one isoleucine locus have been partly localised.

There were two groups of lysine mutants suitable for further analysis. The lys-51(FL) locus with 14 alleles, located on the right arm of the first chromosome with marker genes pro-1 and paba-2 (respectively 6 and 4.5 map units from the lysine locus), and the lys-7(DL) locus with 60 alleles located on the seventh chromosome with the marker genes mal-1 and his-122(EL) (respectively 14.2 and 12.9 map units away). The first of these, the lys-51(FL) locus was chosen because its position in relation to the centromere is known. Twelve of the 14 alleles of this locus can be separated by recombination and can be plotted linearly within the locus (Chapter II). Some mutant pairs as 51 and 74, and 56 and 89 gave very low recombination frequencies of 1×10^{-7} , and the lysine prototrophs obtained were so abnormal that it could not be decided whether the mutants are at the same place or very closely linked. The other recombination frequencies vary from 0.03 to 26.9×10^{-5} . By comparison with the results of other investigators, the lys-51(FL) mutants appear to be spread over a very short stretch. They are clustered in three groups (A, B and C) of still more closely linked mutants. Interallelic complementation has not been observed.

The behaviour of the marker genes in the lysine prototroph recombinants has been studied (Chapter III). As expected there appeared a negative interference (NI). The intensity of NI is in practically no crossing equal on both sides of the investigated area, so that one can speak of a polarised NI. A correlation has been found between the position of the alleles within the gene locus and the pattern of the NI. By studying the crossings between mutants in the cluster B it was seen that near mutant 12.21 there is a critical middle point. The crosses between mutants proximal of this point give a proximally directed NI, while crosses between those mutants distal to this point give a distally polarised NI. There are thus two basic patterns of NI; one proximally oriented and one distally oriented on which the recombination frequencies themselves exert no influence. When two mutants lying on opposite sides of this point are crossed the NI basis-patterns interfere with each other whereby their respective contributions towards the final outcome are approximately proportional to the distances by which the mutants are separated from the point 12.21. In its total amount, the NI was more or less constant for all the crosses.

These results are compared with the various pertinent hypotheses such as "fixed effective pairing", "polaron model", and "polaron

hybrid hypothesis" all of which suppose the genetic material to be divided into segments, connected by neutral connecting material, segments within which the phenomena of recombination take place ("recombination regions"). The data from the *lys-51*(FL) locus in *Aspergillus nidulans* fit into some of these hypotheses when one considers the locus to be divided over two segments. The critical "midway" point would then mark the transition between the two segments. The usual interpretation however is that one segment coincides with one gene. It seems unlikely that a gene as a functional unit could be interrupted by a chemically different structure (neutral connecting element). One wonders whether connecting elements are the only borders of the "recombination regions" or if other features as e.g. special configurations of the DNA act perhaps in a similar way. One must remember that the presence of the neutral connecting material is still hypothetical. It does not seem to be correct on the basis of the data obtained to consider a "recombination region" or "polaron" as equivalent to one gene.